HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on homodimer of glucocorticoid receptor and transcriptional regulation in single-cell level using fluorescence correlation spectroscopy and microwells. [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	大浅, 翔
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12262号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61730
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Sho_Oasa_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士　（生命科学）　　氏 名　大 浅　　翔

審査担当者　主 査　教 授　金 城 政 孝
副 査　教 授　綾 部 時 芳
副 査　教 授　芳 賀 永
副 査　准教授　福 井 彰 雅

学 位 論 文 題 名

Study on homodimer of glucocorticoid receptor and transcriptional regulation in single-cell level using fluorescence correlation spectroscopy and microwells.
（蛍光相関分光法とマイクロウェルを用いたシングルセルにおけるグルココルチコイド受容体の二量体と転写制御に関する研究）

博士学位論文審査等の結果について（報告）

グルココルチコイド受容体(glucocorticoid receptor; GR)は核内受容体ファミリーに属し、免疫や代謝などに深く関与する。GR はリガンド刺激により核へと局在し、核内でホモ二量体で標的遺伝子の転写を制御する事が知られている。しかしながら、GR のホモ二量体と転写制御の間における関係については、未だに不明である。そこで、本研究は GR のホモ二量体と転写活性の関係を明らかにする事を目的とし、単一細胞測定が可能なシステムの構築とそのシステムを用いて単一細胞レベルにおける GR のホモ二量体の濃度と転写活性の定量的な関連解析を行った。

第二章では、単一細胞測定が可能なシステムの確立を目指した。緑色蛍光タンパク質(EGFP)を GR (EGFP-GR)に融合させ、単一細胞由来の EGFP-GR の濃度を定量するために、蛍光相関分光法(fluorescence correlation spectroscopy; FCS)と microwell チップを組み合わせた測定システム(FCS-microwell システム)を構築した。FCS は蛍光分子の分子数や拡散定数を簡便に得る手法である。また、microwell チップは研究室で独自に開発した 113 pL の微小な穴を多数配置した細胞培養チップであり、この microwell に一細胞だけ培養する方法も研究室で確立されてきた。これらの二つの手法を組み合わせる事で、単一細胞由来の EGFP-GR の濃度の定量法を確立した。FCS-microwell システムの性能として、バックグランド補正を組み合わせる事で EGFP の濃度を 2.5 nM から 0.17 nM まで定量下限を 10 倍向上させた。さらに細胞から抽出した全 EGFP が microwell 内に完全に保持されている事も示した。従って、単一細胞由来の EGFP で蛍光標識したタンパク質の濃度を 0.17 nM の領域まで定量可能な FCS-microwell システムが確立された。

第三章では、EGFP-GR のホモ二量体形成に注目した。野生型の EGFP-GR$_{WT}$ を HeLa 細胞に発現させ、FCS-microwell システムにて測定した。FCS 測定より得られる一粒子当た

りの蛍光強度を指標に、単一細胞由来の単量体及びホモ二量体の EGFP-GR_{WT} の濃度をそれぞれ定量した。ホモ二量体形成における解離定数を得るために二分子会合モデル式のフィッティング解析を行い、Dexamethason (Dex)処理した野生型の GR のホモ二量体形成における解離定数は 107±19 nM となった。

第四章では、野生型と二つの変異体(C421G; DNA 結合欠損, A458T; ホモ二量体形成欠損)を内在性の GR が発現していない U2OS 細胞に発現させ、FCS-microwell システムにて測定した。二分子会合モデル式のフィッティング解析により Dex 処理した野生型 GR のホモ二量体形成における解離定数は 409 nM から 137 nM になり、Dex により GR ホモ二量体形成が誘導されている事を示した。また、DNA 結合能を欠損させた C421G 変異体(EGFP-GR_{C421G})及びホモ二量体形成を欠損させた A458T 変異体(EGFP-GR_{A458T})についてもホモ二量体形成における解離定数を定量し、それぞれ 221 nM と 370 nM が得られた。この事から、GR ホモ二量体形成は DNA との相互作用を必要とせず、A458T の変異体によって阻害される事を示した。これらの結果から、FCS-microwell システムにおいて GR の単量体とホモ二量体の濃度をそれぞれ定量し、ホモ二量体形成における解離定数を定量可能である事を示した。また、FCS 測定から得られる拡散定数の解析から、EGFP-GR はホモ二量体だけでなく、内在性の相互作用するタンパク質と複合体を形成している事が明らかになった。

第五章では、FCS-microwell システムを用いて定量された GR のホモ二量体形成とその下流にある標的遺伝子の転写制御の関係に着目した。GR 応答性のプロモーター配列の下流に蛍光タンパク質を組み込んだプラスミドを構築し、EGFP-GR_{WT} もしくは EGFP-GR_{A458T} と合わせて細胞に導入した。FCS-microwell システムにより単一細胞由来の EGFP-GR_{WT} もしくは EGFP-GR_{A458T} のホモ二量体の濃度と GR によって発現誘導された蛍光タンパク質の濃度から転写活性を定量した。EGFP-GR_{WT} 及び EGFP-GR_{A458T} において Dex 処理をした細胞のみにおいてホモ二量体の濃度の増加につれて転写活性の増加がみられた。この結果は、ホモ二量体の濃度と転写活性の間の正の関係性を示唆し、細胞内のホモ二量体濃度の変化に応答して、ホモ二量体により転写制御される下流遺伝子の転写の制御を行っている事を示唆することを明らかにした。

本研究において、生細胞内におけるタンパク質 2 量体化の定量的解析方法を示し、実際にこれまでリガンド結合後は 2 量体として存在すると考えられていた GR が 2 量体または単量体として存在し、ダイナミックに離合集散している可能性をあきらかにした。また FCS-microwell システム法の有用性を示した点についても意義あるものであると考えられる。

よって著者は，北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。